

AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS HEXÂNICO E METANÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA ENCONTRADA NO MUNICÍPIO BARRA DE SANTO ANTÔNIO/AL

Felipe Hermann Pereira dos Santos¹

Analice Santos Reis²

Jesus Ferreira da Silva³

Benedito Ramos da Silva Junior⁴

Simone Beserra da Silva⁵

Ana Cláudia Garcia Medeiros André⁶

Anacássia Fonseca de Lima⁷

Biomedicina



ISSN IMPRESSO 2317-1685

ISSN ELETRÔNICO 2316-6738

RESUMO

A própolis vermelha é uma resina de composição variada e complexa relacionada com a flora de cada região e ao período de coleta da seiva. O extrato bruto da resina foi obtido por maceração em etanol absoluto, com posterior separação do solvente através do método de rotaevaporação. Fracionou-se a solução bruta em duas partes, metanólica e hexânica, preparando, posteriormente, soluções em concentrações padronizadas para 1%, 2%, 5% e 10%. Os ensaios biológicos foram realizados "in vitro" frente aos micro-organismos gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis*) e gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*). As análises foram realizadas de acordo com a metodologia dos testes de sensibilidade no meio ágar Muller Hinton através do gotejamento de 10uL de solução em regiões distintas da placa e a atividade antibacteriana da própolis foi aferida observando-se a formação ou não de halos. O etanol absoluto foi utilizado como controle. O extrato hexânico apresentou maior poder antibacteriano frente às bactérias gram-positivas, em contrapartida, a mesma apresentou inibição apenas para o *P. mirabilis* nas concentrações de 5% e 10%. O extrato metanólico apresentou

ausência de inibição frente o micro-organismo gram-positivo *E. faecalis* em todas as concentrações, contudo, para os gram-negativos foi visto que apenas o *P. mirabilis* e *K. pneumoniae* foram inibidos nas concentrações de 5% e 10%. As demais bactérias não foram inibidas diante dos dois extratos independentemente da concentração utilizada. Diante do observado nos testes antimicrobianos, pôde-se concluir que os extratos de própolis vermelha demonstraram maior atividade antibacteriana contra os micro-organismos gram-positivos do que aos gram-negativos.

PALAVRAS-CHAVE

Própolis Vermelha. Antibacteriano. Alagoas.

ABSTRACT

The red propolis is a varied and complex composition resin related to the flora of each region and the period collection of sap. The crude extract of the resin was obtained by maceration in absolute ethanol, with subsequent separation of the solvent using a rotary evaporator using the method. Crude solution was fractionated in two parts, the hexane and methanol preparing subsequently standardized solutions in concentrations 1%, 2%, 5% and 10%. The biological tests were carried out "in vitro" compared to the Gram-positive microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, and *Pseudomonas aeruginosa*). The analyzes were performed according to the method of susceptibility testing in Müller Hinton agar medium by dripping solution of 10uL in different regions of the plate and the antibacterial activity of propolis was measured by observing the formation of halos or not. The absolute ethanol was used as control. The hexane extract showed higher antibacterial power in the face of gram-positive bacteria, on the other hand, it presented only inhibition to *P. mirabilis* in concentrations of 5% and 10%. The methanol extract showed no inhibition of the Gram-positive front microorganism *E. faecalis* all concentrations, however, for the gram-negative show that only *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* were inhibited at concentrations of 5% and 10%. The other bacteria were not inhibited before the two extracts regardless of the concentration used. Given the observed in antimicrobial tests, it was concluded that propolis extracts showed higher antibacterial activity against microorganisms gram-positive than gram-negative.

KEYWORDS

Red Propolis. Antibacterial. Alagoas.

1 INTRODUÇÃO

A atividade biológica de produtos naturais vem sendo estudada e priorizada nos últimos tempos. A eficácia desses produtos tem sido reconhecida e os desafios propostos referem-se à identificação de novos compostos bioativos, assim como a compreensão dos seus mecanismos de ação (OLDONI, 2007).

Por apresentar uma composição heterogênea de substâncias ativas, os produtos naturais são fontes valiosas para o desenvolvimento de novos compostos medicinais, e estudos recentes mostram resultados promissores (NEWMAN ET AL., 2003).

Em meio a enorme diversidade de produtos naturais existentes no Brasil, os de origem apícola têm apresentado destaque por serem de fácil obtenção e por mostrarem inúmeras propriedades farmacológicas (MENDONÇA, 2011).

A própolis é uma substância resinosa ou algumas vezes cerosa, coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diferentes exsudatos vegetais (VARGAS ET AL., 2004). Devido ao seu baixo custo e as diversas finalidades terapêuticas, dentre elas a atividade antimicrobiana, a própolis é comercializada pela indústria farmacêutica e utilizada na medicina alternativa em vários locais do mundo. Nos últimos anos o comércio da própolis aumentou intensamente, com destaque para a venda dos extratos hidroalcoólicos (ANDRADE, 2010; GARCIA ET AL., APUD MENDONÇA, 2011).

As atividades biológicas da própolis se mostram mais evidentes devido ao crescente consumo deste produto, como alimento funcional, havendo, desta forma, necessidades de maiores estudos sobre a mesma e suas aplicações terapêuticas. A maior parte dos trabalhos encontrados na literatura refere-se à própolis verde, sendo que apenas nos últimos anos a própolis vermelha tem sido objeto de estudo (MENDONÇA, 2011).

Segundo Bruno Bueno Silva (2008), a crescente busca de novas alternativas para o controle e tratamento de diferentes infecções se justifica devido uma série de problemas relacionados à multirresistência, acarretada, na maioria dos casos, por meio do uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos que levam à seleção de micro-organismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (VARGAS ET AL., 2004).

Para redução destes problemas algumas medidas devem ser tomadas tanto as preventivas quanto as de erradicação, porquanto se faz necessário o controle do uso de antimicrobianos, o desenvolvimento de pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuidade dos estudos referentes ao desenvolvimento de novas drogas sintéticas e/ou naturais (NASCIMENTO ET AL., 2008).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana dos extratos hexânico e metanólico de amostra de própolis vermelha obtida no município Barra de Santo Antônio/AL frente bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*).

3 METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Química e Microbiologia da Faculdade Integrada Tiradentes (FITs). A amostra de própolis vermelha foi proveniente do Apiário DAMAS, localizado na Fazenda do Camarão, Barra de Santo Antônio/AL, sendo cedida pelo apicultor autônomo Ivanildo José de Lima Silva sob a forma resinosa em armação de madeira. O material analisado foi unicamente oriundo desse apiário e selecionado de diversas caixas de apicultura.

A própolis vermelha foi avaliada macroscopicamente levando-se em consideração suas características físicas como coloração, textura a temperatura ambiente e odor. A partir disso, houve pesagem em balança de precisão, totalizando 44,79g. Uma pequena porção (3,05g), ainda sob forma resinosa, foi separada, armazenada e mantida sob refrigeração dois a 8° C em frasco de âmbar.

O material obtido foi submetido à extração (maceração) com etanol 99,5%, utilizando volume fixo do solvente (800mL), substituindo-o a cada 72 horas. Esperou-se a sedimentação da fase sólida para transferência da solução obtida (sobrenadante) com filtragem após o processo de extração. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se assim o extrato bruto, sendo a metodologia utilizada para este fim a rotaevaporação a vácuo.

A partição do extrato bruto foi realizada por meio de um processo de partição líquido-líquido com os solventes orgânicos hexano e metanol, o qual se baseia na interação polar entre as moléculas do extrato e os solventes. Após obtenção dos distintos extratos, metanólico e hexânico, foram preparadas concentrações a partir de diluições com solvente específico correspondentes a 1%, 2%, 5% e 10%. A descrição e padronização do processo estão representadas no Quadro 1:

Quadro 1 - Padronização das Concentrações para 1 mL de Solução

Concentração	Peso em MG	Volume do solvente uL
1%	10	990
2%	20	980
5%	50	950
10%	100	900

Esta proporção serviu de base para preparação das soluções hexânica e metanólica para cada solvente utilizado no estudo.

Fonte: Dados dos autores

As amostras bacterianas utilizadas na pesquisa foram cedidas pelo setor de microbiologia do Laboratório Hélia Mendes LTDA, situado na Rua Dom Vital, 2, Farol, Maceió/AL. Todos os repiques bacterianos passaram por identificação prévia, uma vez que se tratam de isolados de amostras clínicas para controle interno dos reagentes, meios de cultura e provas bioquímicas utilizadas na rotina microbiológica do laboratório supracitado. A seleção de tais micro-organismos se justifica devido às altas taxas de isolamento provenientes de amostras clínicas humanas, o que confere maior participação dos mesmos nos processos infecciosos relacionados aos âmbitos: comunitário e nosocomial.

As placas com meio de cultura passaram por prova de esterilização em estufa por 24 horas a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sendo posteriormente armazenadas em geladeira a temperatura de 2 a 8°C . O inóculo bacteriano foi preparado a partir da suspensão de células de crescimento recente (24 horas) em solução salina 0,9%, sendo a densidade ótica acertada até turbidez correspondente a solução de McFarland 0,5 (625 nm, Abs entre 0,08 e 0,1). O número de células de uma suspensão bacteriana pode ser determinado em aproximação, por comparação com os padrões de tal escala (APPLENTON, 2004).

Os ensaios biológicos foram realizados *in vitro* frente aos micro-organismos gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus* spp.) e gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*). Utilizaram-se os testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por meio de gotejamento dos extratos em suas diferentes concentrações no meio ágar Muller Hinton previamente semeado (Método de difusão Kirby-Bauer modificado). O volume de cada gota foi equivalente a 10L para todas as concentrações e o semeio realizado da forma homogênea e uniforme com o auxílio de *swab* estéril sobre a superfície de todo o ágar distribuído na placa, formando uma "espécie de tapete" bacteriano após o crescimento dos micro-organismos.

As leituras dos inóculos foram realizadas após tempo de incubação de 24 a 48 horas a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A sensibilidade bacteriana foi aferida observando-se a formação ou não de halos, sendo descrita como Inibição Presente (IP) e Inibição Ausente (IA). O etanol absoluto foi utilizado como controle para todas as amostras bacterianas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise organoléptica a amostra de própolis vermelha demonstrou aspecto seroso firme, odor balsâmico e coloração vermelha-amarronzada uniforme. Além disso, não apresentou estruturas estranhas aderidas a sua superfície. A mistura produzida após a adição do solvente primário (etanol 99,5%) produziu solução cuja coloração se manteve vermelho-vivo, perdendo intensidade de cor a cada substituição de volume do solvente.

Essa variação das características organolépticas está intimamente relacionada com a flora da região, neste caso a espécie vegetal *Dalbergia ecastophyllum* nativa dos manguezais alagoanos, a qual produz e exhibe seiva avermelhada semelhante à coloração da amostra de própolis utilizada neste estudo, além de outros fatores sazonais.

A utilização do meio Ágar Mueller Hinton se explica devido às características de sua composição, cujas substâncias presentes não interferem no processo de difusão nem na função biológica das soluções preparadas para fins bacteriológicos, especialmente em se tratando dos testes de sensibilidade (APPLENTON, 2004).

A prova de esterilização das placas compreendeu fator importante no processo de análise, pois permitiu avaliação da qualidade dos meios de cultura, assim como a verificação da presença de crescimento de bactérias contaminantes, as quais poderiam sugerir resultados falso-positivos e inviabilizar todo processo. Todas as placas após incubação de 24 horas em estufa a 37°C +/- 2°C se mostraram livres de contaminantes.

A padronização do inóculo de acordo com a escala McFarland a 0,5% nos permitiu melhor reprodutibilidade e validação dos testes de sensibilidade, pois suspensões bacterianas abaixo ou acima das proporções estabelecidas pela escala citada podem produzir leituras errôneas a respeito do poder inibitório, reportando um resultado não condizente com o esperado.

O etanol absoluto foi utilizado como controle devido a sua alta taxa de volatilidade e seu efeito bacteriostático e não bactericida. Diante disso, evidenciou-se que a inibição do crescimento bacteriano foi causada pelas propriedades químicas da própolis vermelha, pois para todas as bactérias o controle se mostrou negativo, ou seja, ausência da formação de halos. Da mesma forma que nos experimentos de Lima e outros autores (2009), cujo álcool na concentração de 70% não promoveu efeito capaz de potencializar a atividade da própolis e alterar os resultados, sendo que neste caso o álcool possui poder bactericida.

Na área médica e veterinária as investigações sobre as propriedades antibióticas da própolis têm sido conduzidas, nas quais o produto tem demonstrado eficiente atividade em relação a diversos gêneros de bactérias (PINTO ET AL., 2001). Segundo estudos de Packer e outros autores (2007), observou-se que a própolis formou halo de inibição frente à cepa de *Staphylococcus spp.* e de *Escherichia coli*.

Marcucci e outros autores (2007) relataram que a atividade antibacteriana da própolis é maior sobre bactérias gram-positivas, devido aos flavonóides, ácidos e ésteres aromáticos presentes na resina, agindo sobre a parede celular dos micro-organismos, entretanto, o mecanismo de ação não foi esclarecido.

De acordo com Takaisi-Kikuni e Schilcher (1994), o extrato etanólico de própolis inibe o crescimento bacteriano por prevenir a divisão celular e por produzir defeitos na estrutura da parede celular, levando a bacteriolise parcial e à formação de bactérias pseudomulticelulares (policarióticos), e ainda, desorganiza o citoplasma, caracterizado pela presença de espaços vazios ou estruturas fibrosas (fibroulike), além de causar alteração na membrana citoplasmática e inibir a síntese proteica.

Pinto e outros autores (2001), observaram que amostras de própolis demonstraram atividade inibitória sobre *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* Coagulase Negativa e *Streptococcus agalactiae*, mas não mostraram capacidade em inibir o crescimento das amostras gram-negativas. Andrade (2010) refere que o efeito da própolis vermelha para determinados micro-organismos tem se revelado altamente inibitório, como o descrito para *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* Para Dausch e outros autores (2007) as amostras de própolis vermelha da região Nordeste brasileira apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. Aureus* (ATCC 25953), em concentrações próximas de 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

Neste estudo observou-se que os extratos de própolis vermelha se mostraram mais eficientes frente aos micro-organismos gram-positivos, porém o extrato hexânico apresentou maior poder antibacteriano, uma vez que conseguiu impedir o crescimento em todas as concentrações dispostas no estudo. Para os gram-negativos este extrato apresentou ação inibitória apenas para o *P. mirabilis* nas concentrações de 5% e 10%. O perfil de sensibilidade das bactérias ao extrato hexânico está descrito na tabela abaixo:

Tabela 1 – Perfil de Atividade Antibacteriana para Extrato Hexânico

Micro-organismos	Concentrações				Etanol 99,5%
	1%	2%	5%	10%	Controle
Gram positivos					
<i>Enterococcus faecalis</i>	IP	IP	IP	IP	IA
<i>Staphylococcus aureus</i>	IP	IP	IP	IP	IA
<i>Streptococcus agalactiae</i>	IP	IP	IP	IP	IA
Gram negativos	1%	2%	5%	10%	Controle
<i>Escherichia coli</i>	IA	IA	IA	IA	IA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IA	IA	IA	IA	IA
<i>Proteus mirabilis</i>	IA	IA	IP	IP	IA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IA	IA	IA	IA	IA

*IA= Inibição Ausente

*IP= Inibição Presente

Fonte: Dados dos autores

Em contrapartida as concentrações metanólicas só não se mostraram eficientes contra o micro-organismo gram-positivo *E. faecalis* e, em relação aos gram-negativos foi visto que para as espécies *P. mirabilis* e *Klebsiella spp.* as soluções mostraram atividade inibitória apenas nas concentrações de 5% e 10% (Tabela 2). Comprovando, deste modo, as afirmações de Andrade e outros autores (2010) que a própolis demonstra parcial efetividade ou inatividade em relação ao grupo de bactérias gram-negativas como: *E. coli*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.* e *Klebsiella spp.* Todos os outros micro-organismos restantes apresentaram ausência de inibição para os dois extratos independentemente da concentração utilizada.

Tabela 2 – Perfil de Atividade Antibacteriana para Extrato Metanólico

Micro-organismos	Concentrações				Etanol 99,5%
	1%	2%	5%	10%	
Gram positivos					Controle
<i>Enterococcus faecalis</i>	IA	IA	IA	IA	IA
<i>Staphylococcus aureus</i>	IP	IP	IP	IP	IA
<i>Streptococcus agalactiae</i>	IP	IP	IP	IP	IA
Gram negativos	1%	2%	5%	10%	Controle
<i>Escherichia coli</i>	IA	IA	IA	IA	IA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IA	IA	IP	IP	IA
<i>Proteus mirabilis</i>	IA	IA	IP	IP	IA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IA	IA	IA	IA	IA

*IA= Inibição Ausente

*IP= Inibição Presente

Fonte: Dados dos autores.

A partir disto, verificou-se que a própolis apresenta eficiente atividade contra micro-organismos gram-positivos e atividade reduzida contra gram-negativos, obtendo assim, resultados parcialmente semelhantes aos descritos na bibliografia utilizada e citada no corpo do trabalho. A variabilidade nos resultados pode ter ocorrido devido à diferença de força da polaridade entre os solventes orgânicos e os constituintes da própolis vermelha, aspecto que necessita de estudos amplos e mais detalhados para o estabelecimento e caracterização do mecanismo de ação deste produto natural como agente antibacteriano, além da relação de sinergismo entre suas moléculas, os solventes e a interação com as estruturas bacterianas.

5 CONCLUSÕES

Diante do observado nos testes antimicrobianos, pôde-se concluir que os extratos de própolis vermelha demonstraram maior atividade antibacteriana contra os micro-organismos gram-positivos do que em relação aos gram-negativos. Deste modo, a

utilização de um produto de fonte natural no tratamento de infecções bacterianas não complicadas em seu estágio inicial colaboraria com a redução e o uso indiscriminado de antibióticos sintéticos, os quais favorecem a aquisição de resistência, além de proporcionarem efeitos adversos devido à sua utilização em longo prazo.

O estudo da atividade antimicrobiana da própolis vermelha oriunda de Alagoas enfatiza a necessidade de divulgação dessa matéria-prima como uma fonte alternativa e simples no tratamento de infecções causadas por bactérias, representando acesso a um produto de fonte confiável e com eficiência comprovada cientificamente.

Por se tratar de um estudo qualitativo se faz necessária à realização de uma pesquisa mais aprofundada em relação à atividade biológica da própolis vermelha, sobretudo como antimicrobiano natural, com a finalidade de validar as informações obtidas por meio de avaliação quantitativa e físico-química das amostras produzidas em território alagoano.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, U. V. C. **Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de culturas de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós-imersão de tetas de vacas leiteiras.** 2010. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia de pós-graduação em tecnologia de alimentos, Curitiba, 2010. p.85.

APPLENTON, A. Teste de Suscetibilidade a Antibióticos: Guia para a Melhor Prática. **Laes e Haes**, ano 25, n.147, fev/mar. de 2004. p.156-168.

DAUGCSH, Andreas et al. **A Própolis Vermelha no Nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas.** Campinas, SP [s.n.], 2007.

LIMA, Ednaldo Queiroga de et al. Avaliação Comparativa da Atividade Antimicrobiana de Própolis *Apis mellifera*, *Melipona subnitida* e *Tetragonisca angustula*. **NewsLab**, São Paulo, ano16, n.93, abril/maio de 2009. p.178-186.

MARCUCCI, M.C. et al. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Mensagem Doce**, n.90. 2007.

MENDONÇA, L. S. **Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha.** 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, Aracajú, 2011.

NASCIMENTO, E. A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, 2008. p.379-386.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod**, v.66, 2003. p.1022-1037.

OLDONI, T. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Ti-radentes, Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, São Paulo, SP, Brasil, 2007.

PACKER, I. et al. Método para Pesquisa e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Produtos de Origem Natural. Curitiba, PA. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.17, ano 1, jan/mar. 2007. p.102-107.

PINTO, M. S.; FARIA, T. E. et al. Efeito de Extratos de Própolis Verde sobre Bactérias Patogê-nicas Isoladas do Leite de Vacas com Mastite. **Braz. J. Vet. Anim. Ali**, n.38, ano 6, São Paulo, 2001. p. 278-283.

SILVA, Bruno Bueno. **Caracterização da própolis vermelha**: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica. Dissertação (Mes-trado) – Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba/SP, 2008.

TAKAISI-KIKUNI, N.B.; SHILCHER, H. Ele microscopic and microcolorimetric investiga-tions of the possible mechanism of bacterial action of defined propolis provenance. **Planta Medica**, year 60, n.3, 1994. p.222-227.

VARGAS, A. C. et al. Efeito Antimicrobiano “in vitro” de Extrato Alcoólico de Própolis. **Ciência Rural**, n.34, ano1, jan/fev. 2004.

Data do recebimento: 28 de Outubro de 2014

Data da avaliação: 5 de Março de 2015

Data de aceite: 5 de Março de 2015

1 Graduando do Curso de Bacharelado em Biomedicina do Centro Universitário Tiradentes – UNIT/AL.

E-mail: felipehermann007@hotmail.com.

2 Graduanda do Curso de Bacharelado em Biomedicina do Centro Universitário Tiradentes – UNIT/AL.

E-mail: ana.asr@hotmail.com.

3 Graduando do Curso de Bacharelado em Biomedicina do Centro Universitário Tiradentes – UNIT/AL.

E-mail: jesus_silva20@hotmail.com.

4 Graduando do Curso de Bacharelado em Enfermagem do Centro Universitário Tiradentes – UNIT/AL.

E-mail: benedito_ramos@hotmail.com.

5 Graduando do Curso de Bacharelado em Biomedicina do Centro Universitário Tiradentes – UNIT/AL.

E-mail: sisibesera@hotmail.com.

6 Docentes do Centro Universitário Tiradentes – UNIT/AL. E-mail: anakk_andre@hotmail.com

7 Docentes do Centro Universitário Tiradentes – UNIT/AL. E-mail: cassialima3@hotmail.com